Vergleichende Untersuchungen zur Methodik der Serumcholinesterase-Bestimmung unter besonderer Berücksichtigung der Hepatitis epidemica

G. Schuhmann

1967

Aus der I. Med. Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. Schwiegk

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR METHODIK DER SERUMCHOLINESTERASE-BESTIMMUNG UNTER BESONDERER BRÜCKSICHTIGUNG DER HEPATITIS EPIDEMICA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von

Gerhard Schuhmann
aus
Immenstadt/Allgäu

München 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universtät München
Berichterstatter: Prof. Dr. W. Lang
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Schwiegk
Dekan: Prof. Dr. F. Holle
Tag der mündlichen Prüfung: 10. 10. 1967

INHALTSVERZEICHNIS

I. Bisherige Forschungsergebnisse über die Serumcholinesterase

II. Methoden der Cholinesterase-Bestimmung

III. Eigene Untersuchungen mit der Acholest-Indikatorpapier-Methode und der Methode nach KALOW

IV. Das Verhalten der Cholinesterase bei der Heptitis epidemica

V. Diskussion der Ergebnisse

VI. Zusammenfassung

I. Bisherige Forschungsergebnisse über die Serumcholinesterase (SChE)

Im Jahre 1914 stellte Dale ein Enzym zur Diskussion, welches Acetyl-Cholin hydrolisiert. Seine Existenz wurde auch von PLATTNER und HINTNER (28) 1930 in fast allen tierischen Geweben, jedoch nicht in der Pflanzenwelt gefunden. STEDMAN (32 + 33) und Mitarbeiter gewannen 1932 vom Pferd ein Serum, das als eine spezifische Esterase für Acetyl-Cholin und andere Cholinester betrachwerden konnte. Hierbei erschienen in den folgenden Jahren mehrere Arbeiten, die sich mit der Aufspaltungsgeschwindigkeit bzw. der Aktivität von Acetyl-Cholin sowohl bei Wirbeltieren als auch bei Wirbellosen befaßten. Das Problem der Existenz einer solchen spezifischen Esterase für Acetyl-Cholin wurde durch die physiologische Funktion dieses Esters noch erhöht.

1932 bemerkten Stedman und Mitarbeiter außerdem — und 1 Jahr später auch Simonast (31), — daß das Enzym des Blutserums nicht nur spezifisch für Cholinester ist, sondern daß es auch Butyrylcholin und Propionylcholin spaltet.
ALLES und HAVES (2) konnten als erste beweisen, daß die Cholin-Esterase des menschlichen Serums sich merklich von der Esterase der menschlichen Erythrozyten unterscheidet, letztere bei einer hohen Konzentration von Acetyl-Cholin gehemmt und im Gegensatz zu der Serum-Cholinesterase Acetyl-I-Methylcholin hydrolisiert wird.

Im Jahre 1943 wählten MENDEL und RUDNEY (26) Benzylcholin als geeignetes Substrat für die Serumcholinesterase und unterschieden zwei verschiedene Typen von reizbaren Eserinen wie Echte- und Pseudo-Cholinesterase. Im folgenden Jahr vermochte AUGUSTINSSON (5 + 6) mittels der Elektrophorese beim Pferd, die Cholinesterase des Serums von der Cholinesterase der Erythrozyten zu trennen. NACHMANSOHN und ROTHENBERG (27) gelang es 1945, die Cholinesterase im Serum, den Nerven, im Muskelgewebe und in den Erythrozyten darzustellen. Diese und weitere Untersuchungen zeigten eindeutig die Existenz von zwei Typen von Cholin-Ester-spaltenden Enzymen, für die auch verschiedene Namen gewählt wurden. BODANSKY, AUGUSTINSSON und ZELLER mit Mitarbeitern konnten beweisen, daß die spezifische Echte Cholin-Esterase des Gehirns und der Erythrocyten nicht auf die Cholin-Ester wirkt. Auf diese Bedeutung der Substrat-Konzentration machte auch 1948 AUGUSTINSSON aufmerksam. Im Hinblick auf die Tatsache, daß diese Esterase eine nähere Verwandtschaft zu Acetyl-Cholin als für irgendeinen anderen Ester zeigte, — soweit ausgetestet werden konnte — und Acetyl-Cholin sehr wahrscheinlich sein physiologisches Substrat ist, wählten AUGUSTINSSON und NACHMANSOHN (6) 1948 den Ausdruck „Acetyl-Cholin-Esterase" (AChE), welcher bei den Enzym-Chemikern allgemein anerkannt wurde.

Das Acetyl-Cholin wird mit Hilfe des Fermentes Esterase in Cholin und Essigsäure gespalten. Dabei spielt die „Ca"-Fällung eine hemmende Wirkung, während Oxalat darauf keinen Einfluß hat. Das Ca-reichere Blut bindet nämlich eine gewisse Menge an Fluorit. Versuche mit NaF führten bereits bei einer Grenzkonzentration von 1/10 000 NaF zu vollkommener Hemmung bei Extrakten an Kaninchenherzen und der Leber (12). Physostigmin erwies sich später als noch wirksamer.

Die beiden verschiedenen Fermente oder Fementgruppen der Cholin-Esterasen müssen unterteilt werden in (1):

1.) die spezifische Cholinesterase, die vor allem im Nervengewebe, aber auch in den Erythrocyten vorkommt. Diese Cholinesterase spielt bei der Reizübertragung auf die motorischen Elemente eine große Rolle. Sie spaltet nur

bestimmte Cholinester wie zum Beispiel Acetyl-Cholin und Acetyl-ß-Methylcholin. Gegenüber Benzylcholin zeigt sie sich jedoch unwirksam. ß-ß'-Dichlordiaethyl-N-Methamin und Coffein wirken hemmend.

2.) die Pseudo-Cholinesterase oder auch Serum-Cholinesterase (SChE) genannt. Sie kommt hauptsächlich im Blutserum und in der Leber vor. Die Leber selbst wird als deren Bildungsstätte angesehen. Die Pseudo-Cholinesterase zersetzt das Benzylcholin und andere Cholinester und wird durch Alkylfluorphosphat, Curare, Percain, Pyrazolderivate und Prostigmin-Präparate gehemmt.

Gelegentlich kommen beide Fermenttypen nebeneinander vor und scheinen sich zu ergänzen oder zu ersetzen. Methodisch ist die SChE leichter zu bestimmen. Bei der Regeneration spielt der im Ferment enthaltene Sauerstoff keine Rolle. Die Cholinesterase der Erythrocyten erholt sich innerhalb von 48 Stunden vom 0-Wert an, während die Regeneration des Plasmas 7 Tage benötigt. (9)

Versuche haben ergeben, daß Disopropylfluorphosphat die Reaktion der Cholinesterase zerstört. Die Wirkung zeigt sich am Muskel, besonders aber an der Nervenendplatte. Es kommt dabei zu schweren Vergiftungen. Die Folge sind Muskelzittern (spontan) und Muskelschwäche bis zur totalen Paralyse. (13)

Morphin in kleinen Mengen hemmt ebenfalls SChE. Auf Grund der Kinetik nahmen 1938 die Autoren F. und M. BERNHEIM (7) an, daß das Morhpin Acetylcholin und Benzylcholin von der Enzymoberfläche verdrängt. Morphin hemmt nämlich die Konzentration des Dünndarms nach Vagusreiz, ohne die Ganglienzellen in der Darmwand zu lähmen (30). Die physiologische Bedeutung der Serum-Cholinesterase ist noch unzulänglich aufgeklärt (22). Aber die Cholinesteraseblocker können als therapeutisch wirksame Stoffe wie Narkosemittel oder toxikologisch als Insektizide wirken, bzw. zu einer Erniedrigung der SChE führen. KALOW (17) und LEHMANN (23) machten 1955 die Beobachtung, daß es heriditär bedingte Fermentmängel oder sogar völliges Fehlen (bzw. Nichtnachweisbarkeit) der SChE gibt.

DOENICKE (11) und Mitarbeiter beschrieben 1963 einen Fall, bei dem enzymhistochemisch in der Leber keine Fermentaktivität nachgewiesen werden konnte. Diese Tatsache wurde bei Anwendung von Narkosemitteln vom Typ des Succinylbicholins (Relaxantien) aufgedeckt. Manche Chirurgen und Anästhesiologen messen dieser Entdeckung eine große Bedeutung zu.

Eine spezifische Diagnostik der Hepatitis epidemica wie routinemäßiger Virusnachweis oder serologische Untersuchungsmethoden konnte bis heute noch nicht entwickelt werden. Es gelten daher als wichtigste diagnostische Methoden der Nachweis der Leberzellschädigung und die Feststellung der entzündlichen Zellreaktion durch die Messung der Transaminaseaktivität. Die hepatozelluläre Schädigung kann mit Hilfe der Serumeiweißbestimmung bzw. der Elektrophorese und der Thymol-Reaktion erkannt werden. Serumeisen, Phosphatase und Cholesterin können zusätzliche Hinweise geben. Die Bestimmung der SChE bei der Hepatitis epidemica hat eine große prognostische Bedeutung, da sie bessere Hinweise geben kann als Serumeiweißproben und Transaminasebestimmungen (20).

II. Methoden der Cholinesterase-Bestimmung

In der heutigen Diagnostik hat die methodische Analytik eine große Bedeutung erlangt. Zum Krankheitsbild und Verlauf kann mit Einschränkung auch die Bestimmung der Aktivität der Cholinesterase herangezogen werden. AMMON (3) vermochte als erster, exakt die Cholinesterase gasanalytisch mit Hilfe der Warburg-Apparatur zu bestimmen.

Für größere Untersuchungsreihen eignen sich jedoch besser solche Verfahren, bei denen die Veränderungen des PH-Wertes durch die Substrathydrolyse im Ansatz gemessen werden. Durch kontinuierliches Zutitrieren von NaOH konnte GLICK (14) den PH-Wert als Ausgangslage aufrechterhalten und an Hand der verbrauchten Lauge in einer Zeiteinheit das Maß für die SChE-Aktivität potentiometrisch bestimmen. Diese Messung erwies sich als sehr genau. MICHEL dagegen zog 1949 den PH-Abfall pro Zeiteinheit zur Ausmessung heran. Mit der Methode von KALOW wird die hydrolytische Spaltung von Benzolylcholinchlorid im Photospektrometer ermittelt. Bei 240 μm kann die Extinktion des Reaktionsgemisches gemessen und der Vorgang nach 3 Minuten wiederholt werden. Die Aktivität der SChE wird aus der Differenz der Ausgangs- und Endmessung errechnet. Ist der Extinktionswert sehr niedrig, muß die Zeit von drei Minuten zur Ablesung von Anfangs- und Endwert verdreifacht (9 Minuten) und anschließend der erhaltene Wert durch 3 dividiert werden. Dadurch können geringe Zeitschwankungen im Ansetzen der Flüssigkeit und Ablesen der Meßinstrumente weitgehendst beseitigt werden. Die Routineuntersuchungen werden heute meist mittels der kolorimetrischen Bestimmung der SChE vorgenommen. Sie sind in der Durchführung wesentlich einfacher, zumal kein großer Aufwand dazu erforderlich ist.

Es handelt sich hier um Methoden, die die PH-Verschiebung kolorimetrisch durch Indikatoren bestimmen. DE LA HUERGA (10) und Mitarbeiter (1952), WOLFSIE (35) und WINTER (1954) arbeiteten erstmals mit kolorimetrischen Methoden. Ein vereinfachtes Testpapierverfahren (Acholest) wurde 1959 von SAILER und BRAUNSTEINER (29) und W. LANG (21) dargestellt.

Die österreichischen Stickstoffwerke haben diese Indikatorpapier-Methode zur Bestimmung der SChE entwickelt. Diese Testmethode wurde an der I. Med. Klinik der Universität München schon seit längerer Zeit verwendet. In der Klinischen Wochenschrift (21) und der Münchner Med. Wochenschrift (22) wies W. LANG auf die SChE und deren Bedeutung für die Diagnose der Lebererkrankungen hin, unter ausführlicher Darstellung der genannten Testpapiermethode.

III. Eigene Untersuchungen mit der Indikatorpapier-Methode und der Methode nach KALOW

Meine Untersuchungen auf dem Gebiet der Cholinesterasebestimmung beschränken sich auf zwei Methoden:

1.) der kolorimetrischen Bestimmung der SChE mittels der Indikatorpapier-Methode

2.) der Methode nach KALOW

Ich machte mit über 250 verschiedenen Seren vergleichende Untersuchungen; zuerst nach der Indikatorpapier-Methode, anschließend zweimal hintereinander nach der KALOW-Methode.

Die Ergebnisse, die nach der Indikatorpapier-Methode schnell zu ermitteln waren, wurden anfänglich außer acht gelassen. Die Ausrechnungen nach KALOW waren wesentlich umständlicher. Ich ließ daher erst mehrere Meßwerte zusammenkommen und errechnete dann später das Ergebnis.

1.) Indikatorpapier-Methode

Die kolorimetrische Bestimmung der SChE fand nach folgenden Gesichtspunkten statt:

Die frischen Seren sind stets in einem Kühlschrank aufzubewahren. In der Zwischenzeit werden 4 Objektträger, das genormte 2 qcm große Testpapier und der ebenfalls 2 qcm große grüne Farbstreifen hergerichtet. Auf zwei Objektträger werden 0,05 ml Serum pipettiert und das Testpapier sowie der Farbstreifen dazugegeben. Diese saugen das Serum sofort in sich auf. Beim Tränken des Testpapiers und des Farbstreifens muß gleichzeitig eine Stoppuhr ausgelöst werden. Um eine gleichmäßige Durchtränkung des Papierchens zu gewährleisten, sollte jeder Objektträger mit einem Deckglas versehen und mehrere Male während der Ablesungszeit leicht zusammengedrückt werden. Bei den Untersuchungen war nach einiger Zeit auf einem Objektträger ein leichter Farbumschlag ins Grünliche eingetreten. Sobald diese Färbung genau die dem beigegebenen Farbstreifen entsprach, wurde die Zeit an der Stoppuhr abgelesen, aufnotiert und die Aktivität der SChE an Hand einer Tabelle aufgesucht und in Prozenten ausgedrückt.

Beispiel: Bei einem angesetzten Versuch dauerte es genau 17 Minuten bis beide Streifen (Farbpapier, und Testpapier-Streifen) die gleiche Tönung erreichten, was einem SChE-Gehalt von 70% entspricht.

2.) KALOW-Methode

Die KALOW-Methode wird im Beckmann'schen Apparat gemessen. Für diese Versuche werden 4 Quarzküvetten mit je 10 mm Durchmesser, PH-Papier, die Reagentien Phosphatpuffer (PH = 7,4), Benzolylcholinchlorit (2×10^{-4}) in Phosphatpuffer (PH = 7,4) ad 1000 a. d. und Dibucain (4×10^{-5}) in Phosphatpuffer (PH = 7,4) ad 1000 a. d., eine Stoppuhr und ein Thermometer benötigt. Alle Reagentien und das zu untersuchende Serum sind im Kühlschrank 1 - 3 Tage aufzubewahren. Die vorbereitenden Maßnahmen beginnen mit dem Herstellen des Leerwertes in einem Verhältnis von 1 : 100. 0,05 ml Serum und 49,5 ml Phosphatpuffer sollen in ein 50 ml Kölbchen pipettiert werden. In der Zwischenzeit wird der Beckmann'sche Apparat eingeschaltet, auf eine Länge von 240 µm (UV-Licht) eingestellt und 10 - 15 Minuten vorgewärmt. Erst dann kann mit dem eigentlichen Versuch begonnen werden.

In alle 4 Quarzküvetten werden exakt je 2 ml Serumverdünnung pipettiert. Küvette „1" erhält zusätzlich 2 ml Phosphatpuffer (PH = 7,4) und wird auf 100 in der Meßskala des Beckamnn eingestellt. Es werden dann in schneller Reihenfolge je 1 ml Phosphatpuffer (PH = 7,4) in die Küvetten „2" und „3" pipettiert, 1 ml Benzolylcholinchlorit (2×10^{-4}) in Phosphatpuffer (PH = 7,4) ad 1000 a. d. in die Küvetten „2", „3" und „4" sowie zum Schluß noch 1 ml Dibucain (4×10^{-5}) in Phosphatpuffer (PH = 7,4) ad 1000 a. d. in die Küvette „4". Der Leerwert der Küvette „1" wird nochmals auf 100 nachgestellt und die Stoppuhr ausgelöst.

Die Werte der Küvetten von „2", „3" und „4" müssen notiert werden. Nach genau 3 Minuten sind wiederum die Werte von den drei obengenannten Küvetten abzulesen und aufzuschreiben. Gleich anschließend muß die Temperatur der Flüssigkeiten in den Küvetten mit Hilfe des Thermometers gemessen werden.

Der Schlußwert nach drei Minuten von Küvette „2", „3" und „4" ist vom Anfangswert abzuziehen, mit 100 zu multiplizieren und auf 26° C umzurechnen. Bei den Versuchen nach der KALOW-Methode wurden bei einer Messung zwei Werte gefunden.

Wert 1 entsprach gleich dem Ergebnis aus Küvette „2"
Wert 2 entsprach gleich dem Ergebnis aus Küvette „3"

	Anfangswert	Schlußwert	Differenz
Wert 1	0,431	0,361	0,071
Wert 2	0,425	0,356	0,069

Das Mittel der Differenz von Wert 1 und 2 betrug 0,070. Dieses Ergebnis wurde zur Berechnung der SChE nach folgendem Prinzip herangezogen:

Beispiel: 0,430 − 0,360 = 0,070 x 1000 = 70
Die Temperatur betrug 22,1° C., was einem Faktor von 1,29 für 26° C. entspricht. 70 x 1,29 = 90,3 SChE nach KALOW.

Die entsprechende Messung wurde mit einer neu angesetzten Verdünnung des gleichen Serums wiederholt. Es trat eine Abweichung gegenüber der ersten Messung (0,070) auf ,wie zum Beispiel 0,064 im Mittel bei 20,9° C. In der Ausrechnung erhielt ich nun einen Wert für die SChE von 89,6%, was nur einen geringen Unterschied gegenüber dem Ergebnis 1 von 90,3% ausmachte. Bei anderen Ausrechnungen traten Differenzen bis zu 4% maximum auf. Dasselbe Ergebnis konnte niemals 100% erreicht werden. Beim Vergleich der Ergebnisse der Indikatorpapier-Methode (Acholest) mit der Methode nach KALOW erhielt ich folgende Tabelle:

Indikatorpapier-Methode	Kalow-Methode
5 %	9,2 E
10 %	18,5 E
15 %	28,0 E
20 %	37,5 E
25 %	47,0 E
30 %	57,0 E
35 %	66,5 E
40 %	76,0 E
45 %	85,5 E
50 %	95,0 E
55 %	104,5 E
60 %	114,0 E
65 %	123,5 E
70 %	133,0 E
75 %	142,5 E
80 %	152,0 E
85 %	161,5 E
90 %	171,0 E
95 %	180,5 E
100 %	190,0 E

Erklärung: Die obige Tabelle zeigt an, wie sich das Ergebnis aus einem Indikatorpapiertest des gleichen Serums zu dem nach dem KALOW-Verfahren verhält. So entsprechen z. B. 10% nach der Indikatorpapier-Methode 18,5 E nach KALOW, und 70% der ersteren gleich 133,0 E nach KALOW.

Nach Abschluß der Versuchsreihen verglich ich die Ergebnisse der Indikatorpapier-Methode mit den nach KALOW errechneten Werten und fertigte danach ein Schema an. Die Ordinate entspricht dem erhaltenen Wert der Indikatormessung und die Abszisse dem der KALOW-Methode. 250 verschiedene Messungen ergaben dann folgende Kurve:

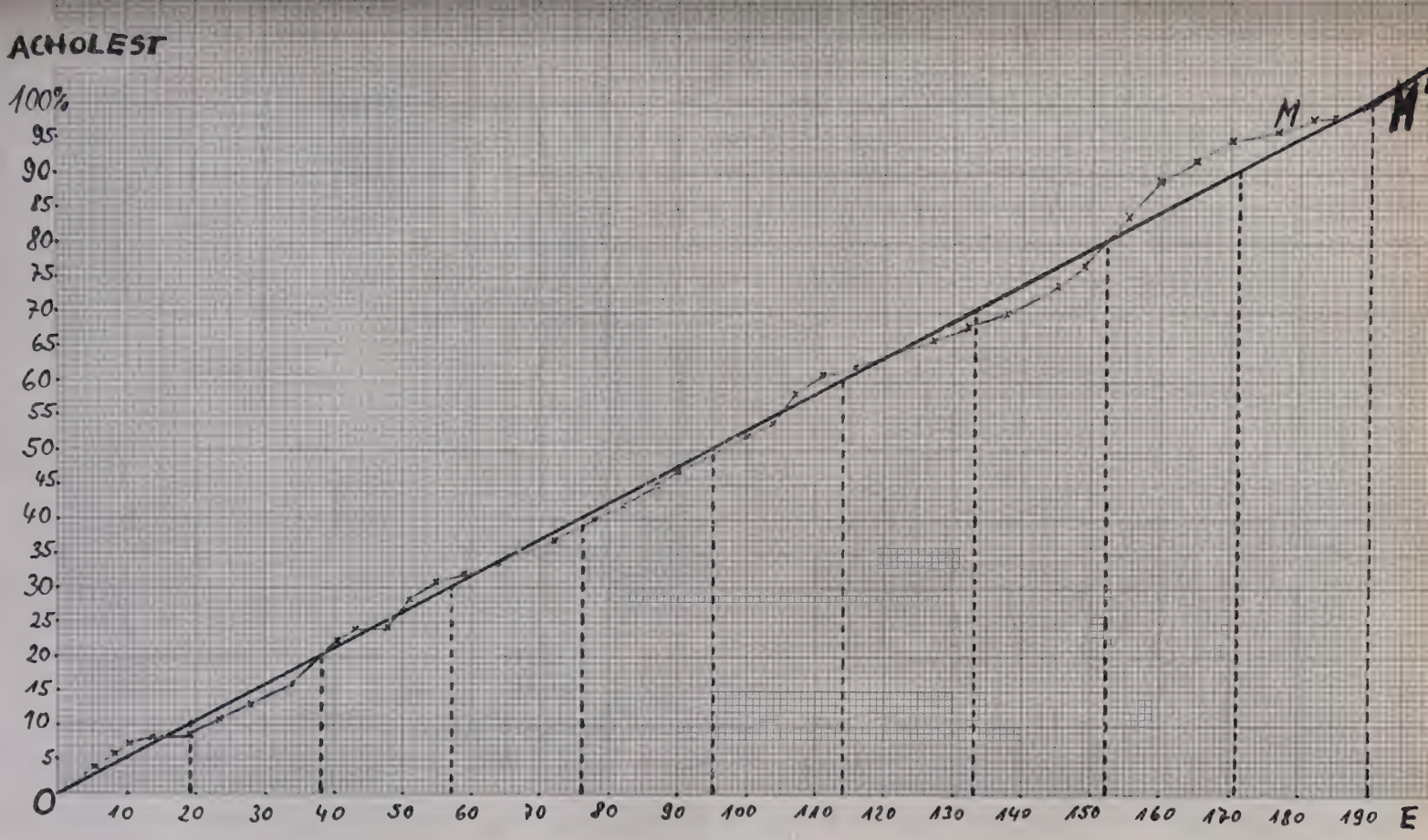

Abb. A: Die Linie M stelit das Ergebnis von 250 verschiedenen Messungen nach der KALOW-Methode (Abszisse) und der ACHOLEST-Methode (Ordinate) dar. Aus der Linie M läßt sich die Gerade M' entwickeln, aus welcher vorstehende Tabelle für den ACHOLEST-Test entstand.

nach KALOW

Bei den 250 Untersuchungen waren nur insgesamt 8 Abweichungen zwischen beiden Methoden bis zu 30% vorhanden. Dies ist dadurch zu erklären, daß Abweichungen bis zu 15% nach oben und unten bei jeder Methode möglich sind. Denn es spielt sowohl beim ACHOLEST als auch bei der KALOW-Methode die Temperatur für den Ablauf der Reaktion eine wesentliche Rolle. Bei üblichen Schwankungen der Zimmertemperatur (ca. 17 - 23 C.) werden die Meßergebnisse allerdings nur unwesentlich verändert. Die meisten Abweichungen zwischen beiden Methoden bewegten sich zwischen 10 - 20%.

IV. Das Verhalten der Serumcholinesterase bei der Hepatitis epidemica

Im ersten Weltkrieg war eine große Zunahme neuer Epidemien zu verzeichnen, die sich sogar im zweiten Weltkrieg noch steigerten. Aus den Jahren des letzten Weltkrieges konnte die Erkenntnis gewonnen werden, daß es sich bei der Hepatitis epidemica um eine Viruserkrankung handelte, die sich über die ganze Welt mit immenser Geschwindigkeit ausgebreitet hatte. Mit Recht kann man heute von einer Pandemie sprechen. Sowohl in der Klinik wie in der Praxis soll nach Meinung von Prof. Dr. H. GROS (15) die Zahl der Leberkranken gegenüber der Vorkriegszeit erheblich zugenommen haben, wobei chronische Erkrankungen überwiegen. Der Autor erklärte sich dies als Folge der Hepatitisepidemien der Kriegs- und Nachkriegsjahre sowie der Hungerdystrophie, an der Millionen Gefangener gelitten haben.

Nach statistischen Untersuchungen von HENNEBERG (16) erkranken bei uns in Westdeutschland jährlich ca. 120 000 Menschen an Hepatitis epidemica. Hierbei wurden nur die eindeutig diagnostizierten Fälle erfaßt. Dies ist so zu verstehen, daß diese Viruserkrankung nicht selten abortiv ohne Ikterus verläuft, so daß die Zahl der Erkrankten wahrscheinlich noch höher liegt. Seit dem 1. Januar 1962 wurde die Meldepflicht in Deutschland eingeführt.

Die Hepatitis epidemica weist einen grippeähnlichen Verlauf auf mit rheumatischen Beschwerden, Dunkelfärbung des Urins, hellem Stuhl und Ikterus.

Zur klinischen Untermauerung der Diagnose sind mehrere Funktionsprüfungen (wie z. B. Transaminase-Untersuchungen) und neuerdings auch die Leberpunktion erforderlich. Das erste pathologische Ergebnis weist eine vermehrte Bromsulphalein-Retention auf, die bald von einer Bilirubinurie gefolgt wird, bevor das Bilirubin im Serum ansteigt. Im voll entwickelten Stadium sind fast alle Funktionsprüfungen pathologisch, welches auf eine Leberzellschädigung hinweist. Es tritt eine Bilirubinurie auf. Das Serumalbumin, die Cholinesterase und das Prothrombin sind vermehrt, dagegen das Gammaglobulin und die Zinksulfattrübung gering vermehrt und die Betaglobuline sogar erhöht. Die alkalische Phosphatase ist verstärkt, erreicht jedoch kaum 10 Bodanski-Einheiten.

Als modernes diagnostisches Hilfsmittel wird neuerdings in der Inneren Medizin die Bestimmung der SChE im Laboratorium zur Differenzierung der häufigen und oft schwerwiegenden ikterischen Krankheitsbildern herangezogen. Der Gehalt an SChE, ein aus der Leber selbst stammendes Ferment, kann Aufschluß über vorhandene Erkrankungen geben. So ist bei der Hepatitis epidemica die Aktivität der SChE oft deutlich verringert (22), während sie z. B. beim Verschluß normal bis erhöht sein kann. Hepatitiden mit bereits initial erniedrigter SChE zeigen im allgemeinen eine wesentlich langsamere Heilungstendenz und verlaufen schwerer wie nach Untersuchungen von W. LANG (22) festgestellt werden konnte. Auch mehrfache Kontrollen der SChE während des Verlaufs können wertvolle Hinweise geben. Rasche Normalisierung spricht für einen günstigen Verlauf.

Auch bei chronischen Hepatitiden läßt die Bestimmung der SChE prognostische Schlüsse zu, da eine stärkere Erniedrigung der Aktivität auf eine unsichere, wenn nicht sogar schlechte Prognose hindeutet, vor allem in Bezug auf die Entwicklung einer Leberzirrhose.

Auf der Infektionsabteilung der I. Med. Klinik konnte ich 18 Fälle von Hepatitis epidemica eingehend bezüglich des Verhaltens der SChE untersuchen. Anfänglich machte ich alle 4 Tage die Untersuchungen des Blutserums auf den SChE-Gehalt hin. Da jedoch die Schwankungen in diesem Zeitraum nicht sehr different waren, wurden die Kontrollen auf einmal wöchentlich begrenzt. Bei diesen von mir beobachteten 18 Patienten konnte folgende Kurve über den Gehalt an SChE als Mittelwert entwickelt werden:

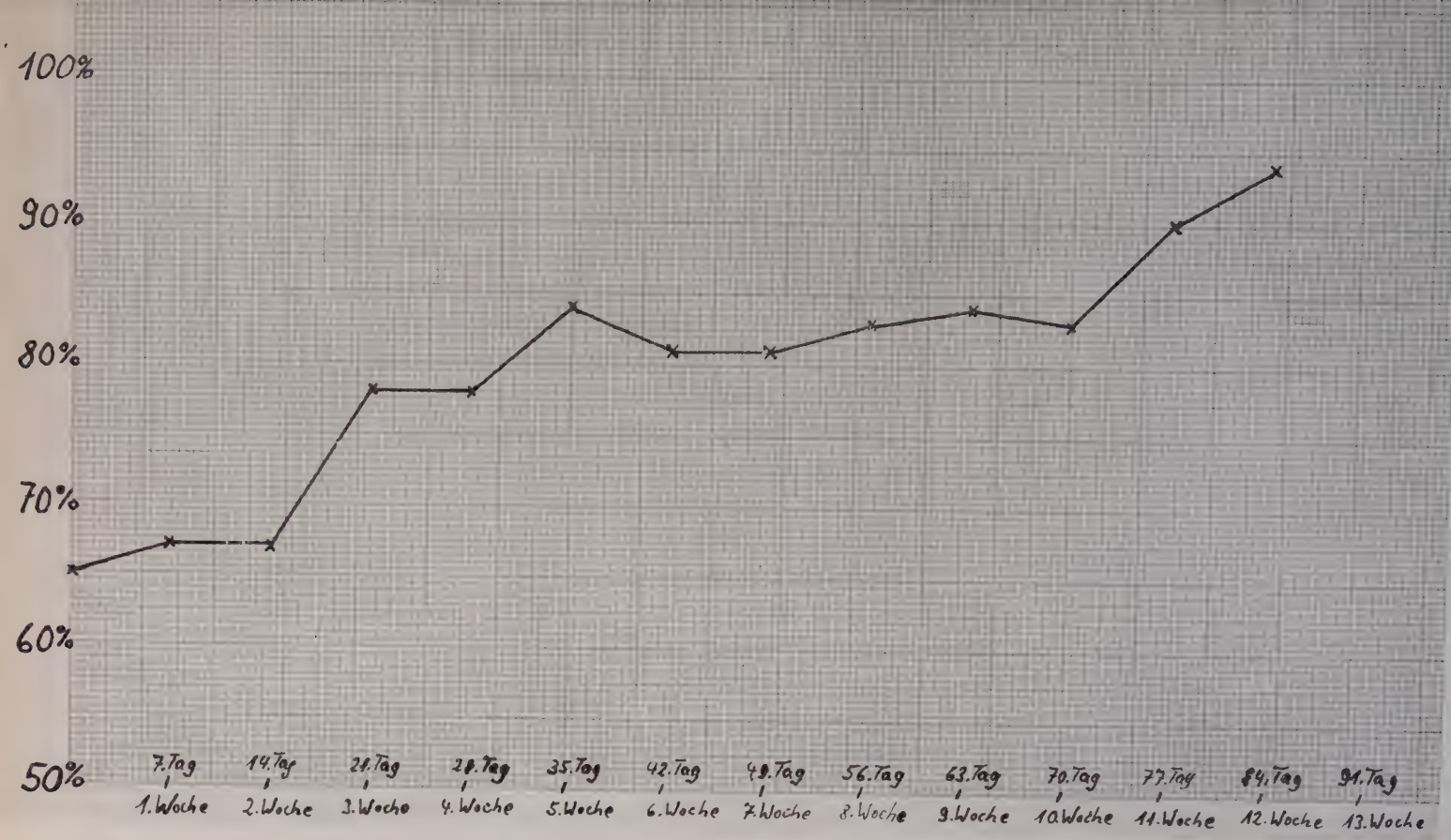

Abb. B: Die Kurve zeigt das Mittel des SChE-Gehaltes (ACHOLEST-Methode) in Prozenten ausgedrückt über einen Zeitraum bis zu 84 Tagen. Als Patientenmaterial dienten 18 an Hepatitis epidemica erkrankte Personen.

Zur Zeit der Einlieferung lag die SChE bei 7 Patienten im pathologischen Bereich, d. h. unter der Grenze der Norm von 70%. Bei drei weiteren an Hepatitis epidemica Erkrankten sank sie später noch ab. Die Werte der Patienten, bei denen die SChE nicht unter die Normalgrenze von 70% abgesunken war, konnte ich für die nächste Kurve weglassen, da ich ein unverfälschtes Bild über den An- und Abstieg der SChE bei der Hepatitis epidemica mit verringertem SChE-Gehalt anstrebte. Von den ursprünglich 18 Fällen blieben am Ende nur 11 zu berücksichtigen, was einen Prozentsatz von 55,5 ausmacht.

Folgende Kurve stellt das Mittel des SChE-Gehaltes bei 11 an Hepatitis epidemica erkrankten Personen dar:

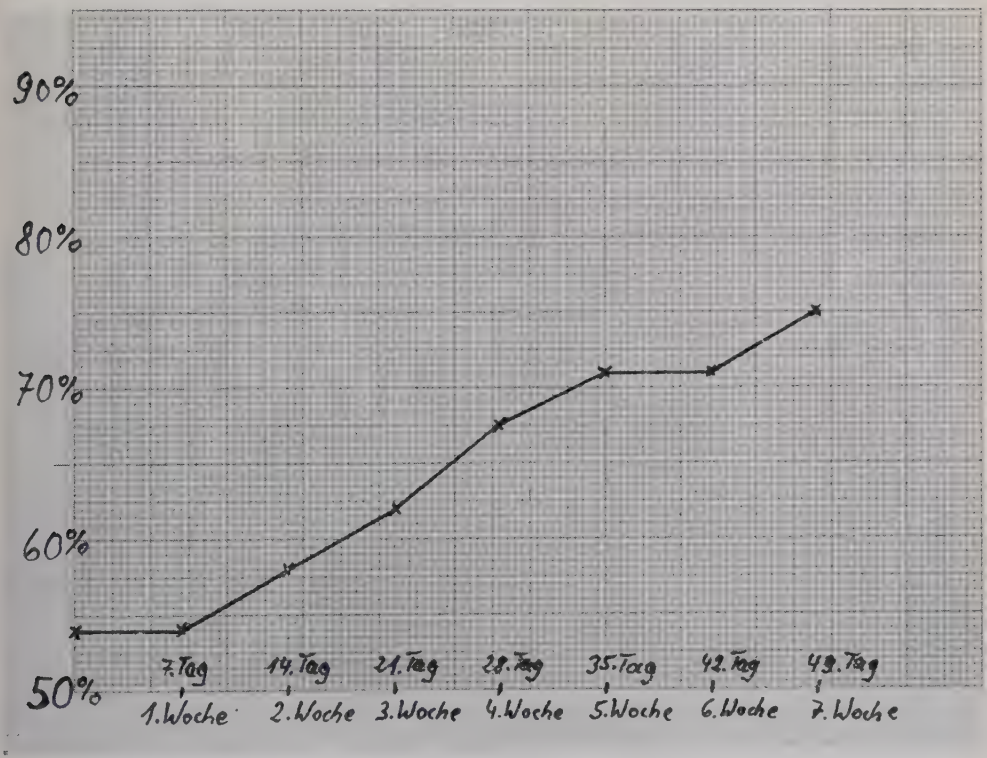

Abb. C: Die Kurve stellt das Mittel der Serumcholinesterase in Prozenten ausgedrückt bei 11 an Hepatitis epidemica erkrankten Personen dar. Bei diesen, für die Kurve berücksichtigten Fällen, lag der SChE-Gehalt unter der Normgrenze von 70%.

Bei dieser Kurve der 11 Fälle, die unter der Normgrenze von 70% lagen, war nach Addition der Werte und anschließendem Dividieren durch die Anzahl der berücksichtigten Fälle kein Abfall der Kurve nach unten zu verzeichnen, obwohl bei der Untersuchung der einzelnen Patienten – mit Ausnahme von zweien ein Absinken des SChE-Gehaltes zwischen der 2. und 5. Woche zu beobachten war. Bei der Kurve kommt dies durch den annähernd konstant ansteigenden Wert nach Einweisung in die Klinik zum Ausdruck.

Die Kurve der SChE bei der Hepatitis epidemica hat einen sehr charakteristischen Verlauf. Als Beispiel hierfür eignet sich besonders das Bild des Krankheitsverlaufes bei dem Patienten Johann R., geb. am 9. 12. 1923. Mit Sicherheit wurde der Patient von seiner Frau infiziert, die bereits 8 Wochen vor ihrem Gatten in die Infektionsabteilung mit Hepatitis epidemica eingeliefert wurde. Zur Anamnese des Kranken sei folgendes gesagt:

Über Erbkrankheiten ist in der Familie nichts bekannt. Auch über durchgestandene Kinderkrankheiten konnte der Patient keine dienliche Auskunft geben. Während des Krieges von 1943 — 46 war Herr R. an Malaria und zur gleichen Zeit an einer Phlegmone am Bein erkrankt. Seit 1949 leidet Johann R. an einem Bandscheibenschaden mit Ischiasschmerz. Seine Leistungsfähigkeit ist dadurch jedoch nicht eingeschränkt.

10 Tage vor seiner Einlieferung traten starke rheumatische Schmerzen in Gelenken, Gliedern und Rücken auf, daneben Verdauungsbeschwerden mit Erbrechen und Appetitlosigkeit, sowie dem Grippesymptom mit Müdigkeit und Laryngitis. Der Urin war dunkler als üblich, der Stuhl anfänglich nicht verfärbt bzw. nicht verändert. Im Laufe einer Woche trat Ikterus auf.

Da aus dem obig genannten Grunde nur eine Hepatitis epidemica in Betracht gezogen werden konnte, wurden lediglich noch die klinischen und biochemischen Befunde benötigt, um die Diagnose hinreichend zu sichern.

Bei der klinischen Aufnahme war der Patient Johann R. deutlich ikterisch verfärbt, das Serumbilirubin auf 5,9 mg% erhöht, sowie die Serumtransaminasen (SGOT 132,8 mE/ml, SGPT 91,0 mE/ml), das Serumeisen (252,0 gamma %) und der Thymolwert (3,2 MLE) erheblich über die Norm angestiegen. Der Anfangswert der SChE betrug anfänglich 49%. Über den weiteren Verlauf der SChE gibt folgende Kurve Aufschluß:

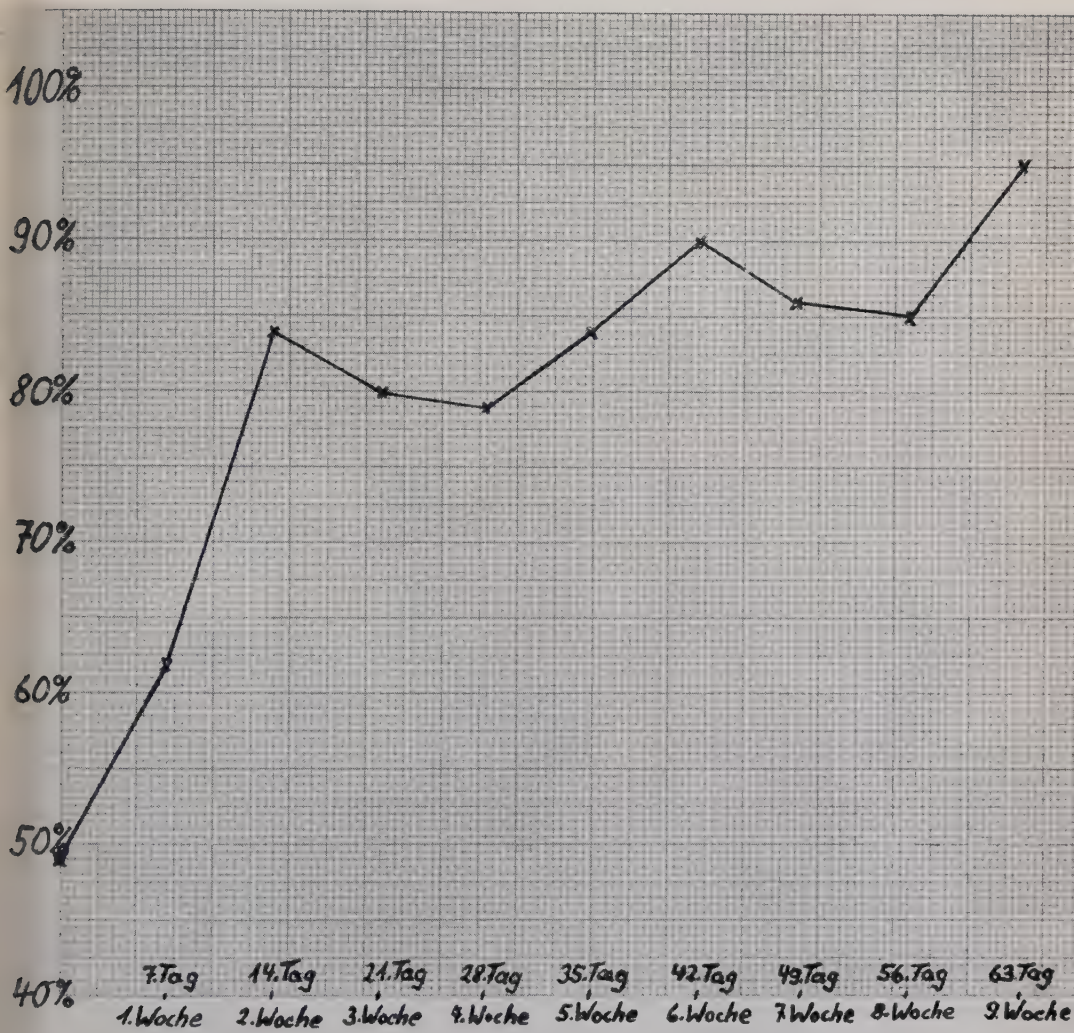

Abb. D: Die Kurve zeigt den SChE-Gehalt in Prozenten ausgedrückt bei dem 9-wöchigen Krankheitsverlauf eines an Hepatitis epidemica erkrank-Patienten.

Die mit der percutanen Leberbiopsie mit der Menghini-Nadel am 3. 8. 1965 gewonnenen Leberzylinder zeigten, daß es sich um eine abklingende, aber noch nicht abgeklungene Virushepatitis mit mäßiger, diffuser fein und mitteltropfiger Verfettung der Leber handelte. Bereits 9 Wochen nach Einlieferung konnte der Patient Johann R. als geheilt nachhause entlassen werden.

Zur Erstellung der Diagnose sind neben den klinischen Untersuchungen auch die Funktionsprüfungen unbedingt erforderlich. Von den 18 untersuchten, an Hepatitis epidemica erkrankten Patienten, wiesen 15 Fälle eine Erhöhung des Serumeisens auf. Bei 10 Patienten war eine vermehrte Aktivität der Transaminasen zu verzeichnen. Das Gammaglobulin blieb bei lediglich 4 Fällen in der Norm von unter 20%, während bei 11 Erkrankten eine leichte Erhöhung bis zu 25%, bei 2 Patienten bis zu 30% und bei einem Fall sogar von 31% eintrat. Nur bei zwei erkrankten Personen lag der Tymolwert unter der Norm von 2% nach Keilling. Das Serumbilirubin war achtmal über 15 mg% angestiegen.

Statistisch lassen sich diese Zahlen jedoch nicht auswerten, da die Anzahl der von mir untersuchten Fälle zu gering ist. Aufgabe dieser Arbeit war, das Indikatorpapier-Testverfahren mit der KALOW-Methode zu vergleichen und Serumcholinesterase-Bestimmungen bei den an Hepatitis epidemica Erkrankten vorzunehmen.

V. Diskussion der Ergebnisse

1.) Die Untersuchungen mit der Indikatorpapier-Methode (ACHOLEST) ergaben, daß damit ein quantitativer Nachweis von Serumcholinesterase möglich ist.

2.) Die Indikatorpapier-Methode stellt eine wesentliche Vereinfachung zur Bestimmung des SChE-Gehaltes des Serums dar.

3.) Für die KALOW-Methode werden zu einer SChE-Bestimmung mit Ansetzen der Lösung und der eigentlichen Messung mindestens 16 Minuten benötigt. Der Indikatorpapier-Test kommt zeitlich dem oben genannten Zeitintervall der photometrischen Methode bei pathologischen Seren ungefähr gleich. Bei extrem vermindertem SChE-Gehalt dauert dieser Versuch unter Umständen sogar länger.

   Die Indikatorpapier-Methode hat jedoch den Vorteil, daß mehrere SChE-Prüfungen auf einmal angesetzt und kontrolliert werden können.

4.) Fehlerquellen bei der Indikatorpapier-Methode können unsaubere Objektträger und ungenaues Pipettieren sein. Außerdem empfiehlt es sich, die Messungen bei Tageslicht wegen des Farbunterschieds bzw. der Farbgleichheit durchzuführen, und zwar möglichst nur von einer Person, da die Beurteilung der Farbgleichheit subjektiven Schwankungen ausgesetzt ist.

5.) Das Serum soll sowohl für den Indikatorpapier-Test als auch für die KALOW-Methode nicht länger als 3 Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.

6.) Die Fehlerquellen bei der KALOW-Methode sind beträchtlich größer. Die Verdünnungen sollen stets frisch und gekühlt sein, und die Quarzküvetten müssen vor jedem Versuch gründlich gereinigt und auf den PH-Wert von 7,4 überprüft werden. Außerdem birgt das mehrmalige Pipettieren bei einem Versuch die Gefahr einer gewissen Ungenauigkeit in sich.

7.) Der Beckmann'sche Apparat sollte stets in einem temperierten Raum stehen. Er muß außerdem ca. 15 Minuten vorgewärmt werden. Aus diesem Grunde sollen die Meßlösungen und das Serum erst kurz vor Beginn des Versuchs aus dem Kühlschrank genommen werden, da die Reaktion bei

erhöhter Temperatur schneller abläuft, und der Wärmefaktor diesen Unterschied nicht ganz auszugleichen vermag.

8.) Für die klinische Diagnosestellung ist die Indikatorpapier-Methode ohne Einschränkung brauchbar, da die methodischen Schwankungen gegenüber der KALOW-Methode nicht entscheidend ins Gewicht fallen. Geringfügige methodische Schwankungen um 10 - 15% sind für die klinische Diagnostik unerheblich. Für die Schwere der Erkrankung ist es im wesentlichen von Bedeutung, ob der Gehalt an SChE sehr stark, stark oder nur leicht abgesunken ist.

9.) Bei 55% der 18 Fälle von Hepatitis epidemica, die mir zur Untersuchung zur Verfügung standen, war ein Absinken von unter 70% SChE zu beobachten.

10.) Die Kurve des SChE-Gehaltes beschreibt bei den an Hepatitis epidemica erkrankten Personen einen wellenförmigen Verlauf, wobei zwischen der 2. und 4. Woche, sowie zwischen der 6. und 8. Woche, ein annähernder Stillstand im Ansteigen der SChE zu sehen ist.

VI. Zusammenfassung

Seit den ersten Beschreibungen eines Enzyms, welches Acetylcholin hydrolisiert, erfolgte eine intensive Forschung über dessen Bedeutung. So fand man zwei Typen des Fermentes mit zum Teil verschiedenen Aufgaben:

1.) die „spezifische" Cholinesterase, die vor allem im Nervengewebe, aber auch in den Erythrocyten vorkommt, sowie

2.) die „unspezifische" (Pseudo-) Cholinesterase, die im Blutserum und in den verschiedenen Organen zu finden ist und als Serumcholinesterase (SChE) bezeichnet wird. Sie kommt speziell in der Leber vor, die als Bildungsstätte des Fermentes angenommen wird.

Da bei einer Lebererkrankung eine Parenchymschädigung auftritt, so muß auch der SChE-Gehalt im Blutserum des Erkrankten vermindert sein. Dieser Nachweis war bei einer spezifischen Lebererkrankung wie z. B. der Hepatitis epidemica möglich.

Aufgabe dieser Arbeit war, die Indikatorpapier-Methode mit der Methode nach KALOW zur Bestimmung des Serumcholinesterase-Gehaltes zu vergleichen.
Das photospektrometrische Verfahren nach KALOW wird an vielen Kliniken verwendet. In neuerer Zeit wurde die Indikatorpapier-Methode entwickelt, die eine wesentliche Erleichterung in Hinsicht auf Zeitaufwand und Materialkosten darstellt. Außerdem können im Gegensatz zur KALOW-Methode gleichzeitig mehrere Versuche nebeneinander laufen.

Der Indikatorpapier-Test gilt heute als ein zuverlässiges modernes Hilfsmittel, mit dem eine Differenzierung der häufigen und oft schwerwiegenden ikterischen Krankheitsbildern möglich geworden ist.

Herrn Prof. Dr. W. Lang möchte ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas und die zahlreichen Anregungen und tatkräftige Unterstützung daknen.

LEBENSLAUF

Als Sohn des Zahnarztes Dr. med. dent. Georg Schuhmann und seiner Ehefrau Marianne, geb. Feiner, wurde ich am 20. Febr. 1937 in Immenstadt geboren. Nach 4 Volksschuljahren in der Heimatstadt besuchte ich das Staatliche Gymnasium in Oberstdorf und legte dort 1958 die Reifeprüfung ab. Nach den vorklinischen Semestern der Zahnheilkunde an der Ludwig-Maximilian-Universität in München bestand ich im SS 1961 das Physikum. Nach zwei klinischen Semestern wechselte ich an die Freie Universität in Berlin, wo ich im August 1964 die Approbation als Zahnarzt erlangte und seitdem als Assistent arbeite.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ADAMS, D. H. und R. H. S. THOMPSON: Biochem. J. 42, 170 (1948)
2. ALLES, G. H. und R. C. HAVES: J. Biol. Chem. 133, 375-390 (1940)
3. AMON, R.: Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1933)
4. ANTOPOL, W., A. SCHIRIN und L. TUCHMAN: Proc. Soc. exp. Biol. (NY) 36, 46, (1937)
5. AUGUSTINSSON, K. B.: Miner. Geol. 18a, Nr. 24, 1-16 (1944)
6. AUGUSTINSSON, K. B. und D. NAHMANSON: Science 100, 98-99 (1949)
7. BERNHEIM, F. u. M. BERNHEIM: Hdb. d. Inneren Medizin 62 (1957)
8. BODANSKY, O.: Am. (NY) Acad. Sci. 47, 521-547 (1946)
9. BROOKS, V. B. und R. GERARD: Am. J. Physiol. 157, 299 (1949)
10. DE LA HUERGA, J., C. YESNICK u. H. POPPER: Am. J. clin. Path. 23, 1126 (1952)
11. DOENICKE, A., TH. GÜRTNER, C. KREUZBERG, J. REMES und W. SPIESS: Act. anaesth. scand. 7, 81 (1963)
12. DUFAIT, R. und L. MASSANT: Encymologia 7, 337 (1939)
13. FREEDMAN, A. M. et al: Am. J. Physiol. 156, 125 (1949)
14. GLICK, D.: Biochem. J. 31, 521 (1937)
15. GROS, H.: Ärztl. Praxis 11, 1935 (1959)
16. HENNEBERG, G.: Bundesgesundheitsblatt (1962)
17. KALOW, W.: Canad. J. Biochem. 34, 637-653 (1956)
18. KAUFMANN, K.: An. intern. Med. 41, 533 (1954)
19. KOMMERELL, G. und F. H. FRANKEN: Dstch. med. Wschr. 81, 1959, (1956)
20. LANG, W.: Ärztl. Praxis 11, 1935 (1959)
21. LANG, W. u. G. INTSESULOGLU: Klin. Wschr. 6, 312-317 (1962)
22. LANG, W.: Mü. Med. Wschr. 33, 1598-1602 (1963)
23. LEHMANN, H. V.: Lancet (1956) 11, 124
24. MAIER, E. H.: Dtsch. med. Wschr. 81, 1674 (1956)
25. MAIER, E. H. und R. FISCHER: Klin. Wschr. 32, 266 (1954)
26. MENDEL, B. und H. RUDNEY: Biochem. J. 37, 59 (1943)
27. NACHMANSOHN, D. und M. ROTHENBERG: J. Biol. Chem. 158, 653-666 (1945)
28. PLATTNER, F. u. H. HINTNER: Pflügers Arch. ges. Physiol. 225 19-25 (1930)
29. SAILER, S. u. H. BRAUNSTEINER: Klin. Wschr. 37, 986 (1959)
30. SCHAUMANN, W.: Hdb. d. experim. Pharm. 12, 187
31. SIMONAST, A.: Rev. belg. Sci. med. 5, 73 (1933)

32. STEDMAN, E. et al: Biochem. J. 26, 2056 (1932)
33. STEDMAN, E. u. E. STEDMAN: Biochem. J. 31, 817 (1937)
34. STEFFENELLI, N. u. F. WEWALKA: Wien. klin. Wschr. 808 (1958)
35. WOLFSIE, J. H. und G. D. WINTER: Arch. industr. Hyg. 9, 396 (1954)
36. ZELLER, E. A.: Advanc. Enzymol. 8, 459-495 (1948)